人金属硫蛋白在乳酸菌中的融合表达及其预防食源性镉污染的应用*

彭德莲[1] 刘霞[1] 黄亚东[1,2] 肖雪[1,**] 苏志坚[1]

（1 暨南大学生命科学技术学院细胞生物学系，广州，510632）

（2 广东省生物工程药物重点实验室，广州，510632）

摘要 目的：镉（Cd）是一种重要的环境污染物，其具有半衰期长、不能生物降解等特性使之易于在人体重要脏器中蓄积并对人身体健康造成不可逆的损伤。为此，减少镉的摄入，尤其是经胃肠道，是预防人体慢性镉中毒的有效方法。方法：构建以α-半乳糖苷酶作为筛选标记、表达金属硫蛋白融合蛋白（GST-SUMO-MT）的重组乳酸乳球菌 MG1363/pM-GSMT。原子吸收光谱法分析重组乳酸菌对 Cd^{2+} 和锌离子的结合能力。以灌胃方式，对雄性 Sprague-Dawley 大鼠每天口服不同剂量的重组乳酸菌（2×10^9-2×10^{11} CFU/d）及 $CdCl_2$ 溶液（5mg/kg/d），连续处理 56 天。收集实验动物肝、肾、脑及睾丸，利用原子吸收光谱法检测这些脏器中镉离子的含量。生化分析检测血清中尿素及丙氨酸转氨酶的含量。石蜡切片及苏木精-伊红染色分析各组织的病理变化。结果：获得不含抗生素抗性的重组乳酸菌 MG1363/pM-GSMT，其吸附 Cd^{2+}、Zn^{2+} 能力比对照组分别提高 3.52 和 1.60 倍。动物实验结果显示，镉能在肝、肾、脑及睾丸中蓄积，并对这些器官造成明显的病理损伤。原子吸收光谱分析、血清生化指标及病理切片结果都显示，重组乳酸菌能有效降低胃肠道中镉的摄入，进而减少 Cd^{2+} 在各脏器中的蓄积及对器官功能的损伤。结论：本研究为预防人体食源性慢性镉中毒提供了一种有效的生物材料和使用方法。

关键词 重组乳酸菌；金属硫蛋白；镉污染；预防

中图分类号

收稿日期：2017.09.15 修回日期：2017.10.16 *广东省高等学校珠江学者岗位计划（2012-2017 年度）和广东省海洋经济创新发展区域示范专项项目资助（GD2012-B01-005）

**通讯作者，电子信箱：wency_23@163.com

镉是一种重要的工业和环境污染物，主要来源于电镀、金属冶炼、合金制造、油漆和塑料等工业生产[1]。镉并不是人类生存所必需的金属元素，其生物半衰期达到10-30年，被人体摄入后会选择性地沉积在肝脏、肾脏、生殖器官及甲状腺等多种组织中。更为重要的是，镉可以在多种生物体内富集，并通过食物链最终进入人体[2]。临床研究已经证实，人体长期摄入含镉的食物可引起如癌症、肾病、软骨病、贫血及不育等严重后果[3-6]。为此，世界卫生组织已明确镉离子（Cd^{2+}）为食品重点污染物之一，美国环境保护署也将镉归为B1类致癌物，而美国毒物和疾病登记署（Agency for Toxic Substances and Disease Registry，ATSDR）更将镉列为严重危害人体健康物质之一（第7位）[7, 8]。

随着我国工业和城建的大规模发展，大量含有镉的废水及土壤被人们随意排放和安置，导致人类的饮用水源及耕地受到污染，再通过灌溉、种植等途径进一步积聚在农作物和经济动物中。近几年来，我国湖南地区的“镉大米”、中港两地的“镉杨桃”以及广西地区因镉污染而引起经济鱼类大量死亡等事件表明，镉污染已经对我国国民身体的健康产生严重的威胁和影响[9, 10]。

在临床上，对于急性镉中毒患者，一般采用口服泻药或螯合剂来减少 Cd^{2+}经胃肠道进入人体，其中最为有效的螯合类药物包括二巯基琥珀酸（DMSA）、二巯基丙烷磺酸盐（DMPS）以及二硫代氨基甲酸二乙酯（DDTC）[11-13]。然而，到目前为止，尚未有高效药物用于治疗人类慢性镉中毒。因而，减少或者防止有毒 Cd^{2+}经胃肠道摄入是彻底解决 Cd^{2+}对人体危害的关键策略。

金属硫蛋白（metallothionein，MT）是一类广泛存在于动物、植物和微生物体内的低分子量、富含半胱氨酸的蛋白质[14]。研究表明，MT 通过其分子内半胱氨酸的巯基和 Cd^{2+}结合，可以显著减少镉诱导产生的细胞毒性[15-17]。更为重要的是，MT 与镉的结合强度比与锌结合的强度大约高 2000 倍。然而，由于胃肠道中存在大量的蛋白酶，通过直接口服 MT 来防止食物和水中的 Cd^{2+}进入人体是不切实际的。

乳酸乳球菌是一种被广泛应用于食品工业的革兰氏阳性菌，其可在人体胃肠道中存活但不定殖、不产生内毒素脂多糖等优点使其成为业界公认的对人体无害的微生物（Generally Regarded as Safe，GRAS）[18]。现时，乳球菌的遗传特性已全部知晓，并被成功开发为重组蛋白表达宿主及治疗载体，用于将蛋白药物送至鼻腔、口腔及生殖器粘膜等表面[19]。

乳酸菌能吸附多种重金属离子，其过程主要包括金属离子在菌体表面积聚以及经细胞膜上多种离子通道进入细胞内并富集的过程。在前期研究中，我们利用两种分子伴侣 GST 和 SUMO 同时作为表达 MT 的融合标签，在乳酸乳球菌中组成型表达可溶性重组融合蛋白

GST-SUMO-MT。该融合蛋白可以结合胞内的铅离子成为无毒复合物，进而降低细胞外环境中铅离子的含量及其对宿主的毒害作用[20]。

基因工程菌通常需要各种抗生素作为筛选标记，这些抗生素包括青霉素、氯霉素、红霉素等，然而，这些抗生素也在临床上用于治疗人类的多种疾病，如肺结核、细菌性肠胃炎等[20]。研究表明，细菌内的编码抗生素水解酶的基因可以在肠道菌群内发生水平转移，这就意味着其它肠道菌（正常或者有害菌）都有机会获得这些抗性基因而获得抗性，影响临床治疗的效果[21, 22]。本研究使用对人体安全的食品级标记替代抗生素抗性标记，以建立食品级选择性标记的载体。

在本研究中，我们将构建一个利用蜜二糖作为筛选标记、组成型表达融合蛋白GST-SUMO-MT的食品级乳酸乳球菌，并通过大鼠灌胃实验观察该活菌制剂对大鼠慢性镉中毒的预防作用。

1. 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 *Lactococcus lactis* MG1363 及 pMG36e 购自荷兰 NIZO 公司；*Escherichia coli* JM109 购自宝生物工程（大连）有限公司；*Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 购自广东微生物研究所；重组乳酸菌表达质粒 pMGST 保存在广州暨南大学医药生物研究开发中心。

1.1.2 试剂 限制性内切酶 *Sac* I、*Sph* I、H*pa* I、T_4 DNA 连接酶，Taq DNA 聚合酶，购自大连宝生物工程有限公司；限制性内切酶 E*ar* I 购自 NEB 公司。所有核酸分离纯化试剂盒、PCR 检测试剂盒及连接转化试剂盒均购自大连宝生物工程有限公司。蜜二糖、M17 肉汤培养基、溴甲酚紫购自美国 BD 公司；兔抗人源 MT 单克隆抗体购自 SANTA 公司。

1.1.3 实验动物 SPF 级雄性 Sprague-Dawley（SD）大鼠，42 只，35-40 日龄，体重为 120～140g，购自广东省实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 重组质粒pGMG1的构建与鉴定 **表**达人MT-1融合蛋白重组质粒的构建方法如图1。简言之，提取 *L. plantarum* ATCC 8014 基因组作为模板，并利用 PCR 方法扩增得到编码α-半乳糖甘酶（α-galactosidase, melA）的 DNA。然后，将 melA 基因用限制性内切酶 *Sac* I 及

Sph I 消化并克隆到经相同酶处理的载体 pMG36e 中，获得重组质粒 pM-MG。以 pGSMT 为模版，利用 PCR 方法获得含有 P32 启动子序列及编码谷胱甘肽 S-转移酶、小分子泛素相关修饰因子和人 MT-1 融合蛋白（GST-SUMO-MT，GSMT）的 DNA 片段（表 1）。

利用 *Ear* I 处理该 DNA 片段及 pM-GM 载体，然后将两者连接构建成重组质粒 pM-GSMT-E 转化到大肠杆菌 JM109 中，并进行序列测序分析。最后，用 H*pa* I 处理含有准确核酸序列的 pM-GSMT，除去红霉素基因后，通过平端连接方法获得最终重组载体 pM-GSMT。利用电转化的方法，将 pM-GSMT 转入 *L. lactis* MG1363 中，获得重组转化菌株 MG1363/pM-GSMT，菌落 PCR 方法鉴定转化子。

表 1. 重组质粒构建 PCR 引物表

Table 1. PCR primers for construction of recombinant plasmid.

Primers names	Sequences (5'-3')	Orientation	Enzyme sites
P32-GSMT-F	ATCGCCTCTTCAGCCGTTAACAGATTAATAGTTTTAGC	forward	*Ear* I、*Hpa* I
P32-GSMT-R	GAGAGAGCTCGAAGAGTTAAGCACAACATGAACATTTTT	reverse	*Ear* I

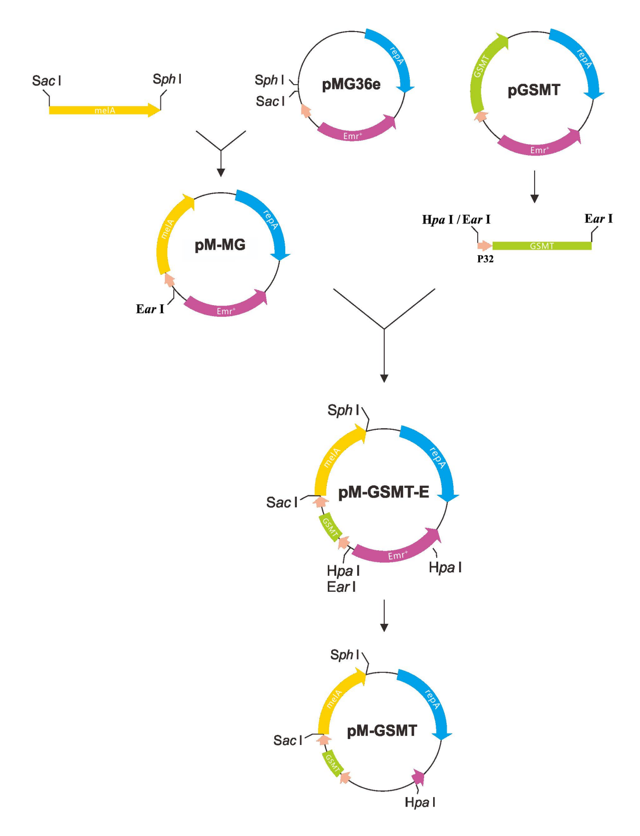


图 1. 重组质粒 pM-GSMT 构建流程图

Figure 1. The constructed diagram of recombinant plasmid pM-GSMT

1.2.2　蜜二糖酶活性检测　配制溴甲酚紫（MBCP）培养基：在 1L 水中，加入蛋白胨 20g、酵母粉 5g、氯化钠 4g，乙酸钠 1.5g、溴甲酚紫 40mg 及琼脂粉 12g，加水定容至 950ml 后，

121℃高压灭菌 15 min，待培养基温度下降到 50℃左右，加入 50 ml 过滤除菌的 10%蜜二糖溶液，摇匀并制备抗性（含 100 μg/ml 红霉素）和非抗性 MBCP 平板。将重组乳酸工程菌 MG1363/pMG36e 和 MG1363/pM-GSMT 接种到 MBCP 平板上，30℃厌氧培养 48h 观察平板颜色的变化。

1.2.3　重组融合蛋白 GSMT 的表达及其真确性鉴定　在划线平板上挑取单克隆 MG1363/pM-GSMT，接种到 5mL M17 培养基（3.725% M17 肉汤，0.5% 蜜二糖）中，30℃厌氧静置培养 48hr 后，按 5%的接种量转接到 100mL 新鲜培养基中，培养 48h。13,000 rpm 离心 20min，收集菌体并进行 12% SDS-PAGE 电泳分析。利用 GST 亲和凝胶分离纯化 GSMT，然后使用抗人 MT 单克隆抗体进行 Western-blot 分析。此外，使用基质辅助激光解析串联飞行时间质谱仪（MOLDI-TOP-MS）对重组蛋白进行真确性鉴定。

1.2.4　原子吸收光谱法测定离子在重组乳酸工程菌中的聚积　将含有重组菌 MG1363/pM-GSMT、对照菌 MG1363/pMG36e 分别接种到 5mL 含重金属离子的 GM17 培养基中（3.725% M17 肉汤，0.5% 蜜二糖/葡萄糖）。30℃厌氧培养 24 hr 后，按 5%比例转接新鲜培养基培养至 OD_{600} = 0.4。然后，加入终浓度为 400 μM 的 $CdCl_2$ 溶液或 5 mM $ZnSO_4$ 溶液，继续培养 20h。13,000rpm 离心 10min 收集菌体，称重并用预冷的 GM17 培养基洗涤 3 次。将菌体烘干至恒重，取 10 mg 溶于 1 ml 浓硝酸溶液（60%，V/V）中，充分消解后，用 5 倍体积的水稀释并通过原子吸收光谱法测定样品中离子的含量，实验重复三次。

1.2.5　口服重组乳酸工程菌预防大鼠亚慢性镉中毒　将大鼠置于标准 SPF 饲养实验室中，适应性喂饲 7 天后，随机分为 6 组，每组 7 只，分别命名为正常组、模型组、乳酸菌对照组（2×10^{11} CFU/d）、重组乳酸菌高剂量组（2×10^{11} CFU/d）、重组乳酸菌中剂量组（2×10^{10} CFU/d）和重组乳酸菌低剂量组（2×10^{9} CFU/d）。

将重组菌 MG1363/pM-GSMT 及对照乳酸菌 MG1363/pMG36e 接种到 GM17 培养基中培养 12h，然后，按 5%的比例接种于新鲜培养基中，培养至 OD_{600} = 0.8。4℃、12,000 rpm 离心 10min 收集菌体，用灭菌水洗涤 3 次并称重。同时，配制终浓度为 1 mg/mL 的 $CdCl_2$ 溶液。

实验实施主要步骤包括，每天早上口服重组乳酸菌或对照乳酸菌，4 小时后，再以 5mg/kg/day 的剂量口服 $CdCl_2$ 溶液。模型组动物以等体积生理盐水和 $CdCl_2$ 溶液进行处理，而正常组则口服生理盐水。实验周期为 8 周，自由饮水及取食，隔天称重。

实验结束后，断髓处死老鼠，收集血清并利用全自动生化分析仪测定血清生化指标。原子吸收光谱法测定血液和肝、肾、睾丸、脑中镉的含量。此外，对肝、肾和睾丸组织进行病

理形态学分析。

1.2.6 统计分析 所有数据均采用均数±标准差表示，采用单因素 ANOVA 分析，具有显著性差异方法，*为 $p < 0.05$，**为 $p < 0.01$ 及*** 为 $p < 0.001$。

2. 结 果

2.1 重组表达质粒 pM-GSMT 的构建及鉴定

利用 PCR 方法分别获得编码 melA 及含有 p32 启动子 GSMT 融合蛋白的 DNA 片段并连接到载体 pMG36e 上，获得重组质粒 pM-GSMT-E。然后，将 pM-GSMT-E 用 H*pa* I 处理，回收大片段并进行平端连接，获得没有红霉素抗性的重组质粒 pM-GSMT（图 1）。将其转化到乳酸菌 MG1363 中，获得重组表达菌株 MG1363/pM-GSMT。对表达菌株进行菌落 PCR 鉴定，结果显示，重组质粒中能扩增出 melA 基因及带有 p32 启动子 GSMT 融合蛋白的 DNA 片段，其大小分别约为 2.4 kb 及 1.4 kb（图 2-3）。基因测序结果表明，这些基因的序列与 NCBI 数据库中的序列（AF189765.3、M24764.1 和 KP858143）完全一致。

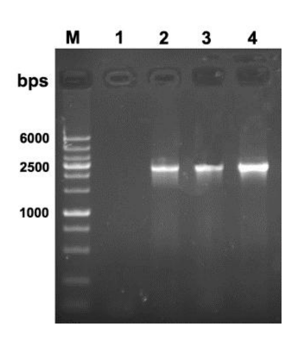


图 2. 菌落 PCR 方法扩增重组质粒中 melA 基因

Figure 2. Agarose gel electrophoresis of the DNA fragment encoding melA, as detected by direct colony PCR.

Lane M, DNA marker; lane 1, negative control (pMG36e); Lanes 2 to 4, the positive transformants (pM-GSMT).

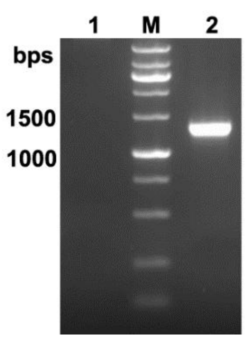


图 3. 菌落 PCR 方法扩增重组质粒中编码 GSMT 基因

Figure 3. Gel electrophoresis of the DNA fragment encoding GSMT, as detected by direct colony PCR.

Lane M, DNA marker; Lane 1, negative control (pMG36e); Lane 2, the positive transformants (pM-GSMT)

2.2 重组菌株抗性分析

溴甲酚紫是一种酸碱指示剂，当 pH 低于 5.2 时呈亮黄色，而 pH 高于 6.8 时呈紫色。重组质粒 pM-GSMT 表达的α-半乳糖苷酶可以水解培养基中的蜜二糖，为宿主生长和合成乳酸提供碳源。将菌株 MG1363/pMG36e、MG1363/pM-GSMT、MG1363/pM-GSMT-E 及 *L. plantarum* ATCC 8014 接种到 MBCP 平板培养 24h。结果表明，接种 MG1363/pM-GSMT 和 MG1363/pM-GSMT-E 的平板呈现亮黄色，表明这些重组质粒表达了有功能的α-半乳糖苷酶。乳酸乳杆菌 *L. plantarum* ATCC 8014 本身就表达α-半乳糖苷酶，因此，接种后也能使平板呈现亮黄色。而乳球菌 MG1363 以及菌株 MG1363/pMG36e 不能水解蜜二糖，因此，这些菌不能在 MBCP 平板上正常生长（图 4）。将 MG1363 及重组菌株 MG1363/pM-GSMT 和 MG1363/pM-GSMT-E 接种到含有红霉素抗性的 GM17 平板中，培养 48h 后结果显示，只有 MG1363/pM-GSMT-E 能在平板上正常生长（图 5）。

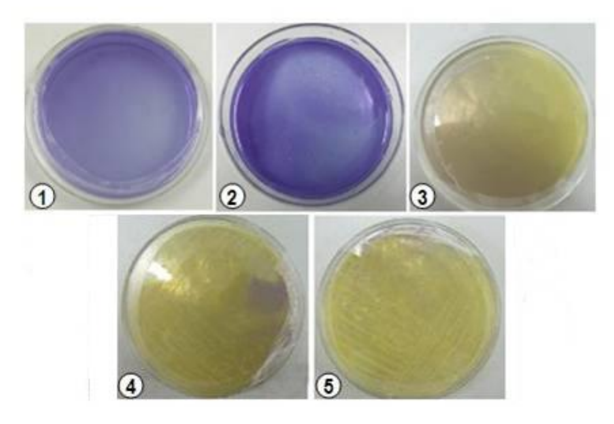


图 4. MBCP 平板检测重组质粒α-半乳糖苷酶活性

Figure 4. α-galactosidase activity of recombinant *L. lactis* strains detected on MBCP plate

1. Blank plate (MBCP)；2. MG1363/pMG36e；3. L. plantarum ATCC 8014；

4. MG1363/pM-GSMT-E；5. MG1363/pM-GSMT

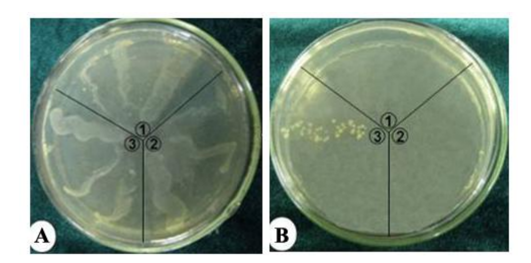


图 5. 重组乳酸菌株对红霉素抗性分析

Figure 5. Tolerance to Erythromycin of recombinant *L. lactis* strains

1：MG1363/pMG36e；2. MG1363/pM-GSMT；3. MG1363/pM-GSMT-E

2.3 重组蛋白 GSMT 的表达及鉴定

按照方法 2.3 对重组菌株 MG1363/pM-GSMT 进行发酵。离心收集菌体后，利用 GST

凝胶亲和层析方法获得重组蛋白 GSMT。SDS-PAGE 电泳结果显示，重组蛋白 GSMT 位于相对分子量 43kD 附近（图 6），最终得率约为 1 mg/L。Western-blot 实验结果提示，该融合蛋白能与人 MT 单克隆抗体呈阳性反应（图 7）。此外，基质辅助激光解析串联飞行时间质谱检测结果也证实，GSMT 蛋白序列与预期的完全相同。

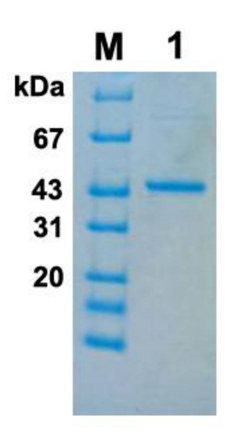


图 6. SDS-PAGE 电泳检测纯化后的融合蛋白 GSMT

Figure 6. SDS-PAGE analysis of the purification of GSMT

Lane M, protein marker; Lane 1, purified GSMT

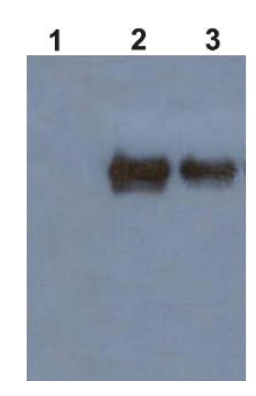


图 7.重组融合蛋白的 western-blot 分析

Figure 7. Western blot analysis of the purification of recombinant GSMT

Lane 1, negative control; Lane 2 and 3, purified GSMT

2.4 重组菌株 MG1363/pM-GSMT 对重金属离子的吸附能力

将 MG1363/pM-GSMT 及 MG1363/pMG36e 分别接种到含 Cd^{2+}或 Zn^{2+}的 GM17 培养基中振荡培养，然后利用原子吸收光谱法测定金属离子在重组菌株中的含量。实验结果显示，Cd^{2+}在 MG1363/pM-GSMT 中的平均积聚含量为 17.6±1.95 mg/g，高于对照组 3.52 倍。而 Zn^{2+}在 MG1363/pM-GSMT 的平均积聚含量则为 3.5±0.62 mg/g，与对照组相比，增加 1.6 倍（图 8）。

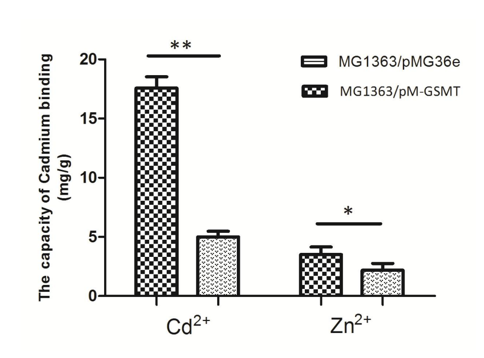


图 8. 重组乳酸菌对重金属离子吸附能力的分析

Figure 8. Metal ions-binding capacity analyses of the recombinant *L. lactis* strains.

2.5 重组乳酸菌减少 Cd^{2+}在实验动物组织中的蓄积

对实验组大鼠口服 $CdCl_2$ 溶液（5mg/kg/d），结果发现，模型组大鼠出现被毛干涩、竖毛、运动迟缓、对刺激反应差、喜蜷卧、畏缩等症状。而正常组、乳酸菌对照组及重组乳酸菌不同剂量组的大鼠在行为方面表现无显著差异且毛发光亮。所有处理组大鼠在实验期间均未出现死亡现象。在体重方面，除了模型组动物在镉暴露 42 天后体重增加变缓外，其它各实验组动物的体重与正常组之间没有显著差异（图 9）。

利用原子吸收光谱法对各实验组动物的肾、肝、脑及睾丸组织进行 Cd^{2+}含量分析，结果显示，Cd^{2+}经胃肠道进入动物体内后，主要蓄积在肾脏和肝脏，而大脑和睾丸相对含量较低。经过 56 天处理后，Cd^{2+}在模型组动物肾脏、肝脏、大脑及睾丸中的含量分别为 16.35±2.39、15.18±2.14、3.48±0.62 和 1.87±0.15 μg/g。口服重组乳酸工程菌可以有效阻止 Cd^{2+}进入体内，且这种效应呈剂量依赖关系（图 10）。高剂量的重组乳酸菌（2×10^{11} CFU/d）可以显著降低镉在上述四种组织中（肾、肝、脑及睾丸）的蓄积，与模型组相比，其含量分别下降了 4.44、5.36、7.57 及 3.22 倍。乳酸菌 MG1363/pMG36e 也能部分减少动物对 Cd^{2+}的吸收，但其预防效果低于重组乳酸菌低剂量组。

随后，利用生化检测方法分析对实验动物血清中尿素及谷丙转氨酶的含量进行分析。与正常组相比，模型组动物血清中的尿素及丙氨酸转氨酶含量显著升高，这个结果提示，Cd^{2+}在肾脏和肝脏中蓄积并对其细胞造成损害。乳酸菌 MG1363/pMG36e 处理组能降低 Cd^{2+}损害的趋势，但与模型组相比并不显著。在另一方面，不同剂量重组乳酸菌处理组的动物体内的尿素及谷丙转氨酶含量与正常组动物之间没有显著差异，这个结果表明，重组乳酸菌能有效降低 Cd^{2+}的蓄积进而减少其对肾肝细胞的损伤（图 11）。

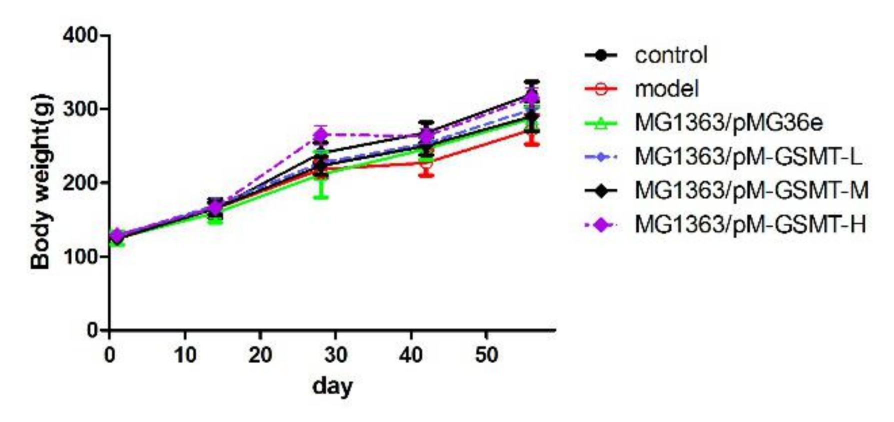


图 9.不同处理组动物饲养过程中体重的变化分析

Figure 9. Weight-change curve of treated rats during feed with or without the recombinant *L. lactis* strains

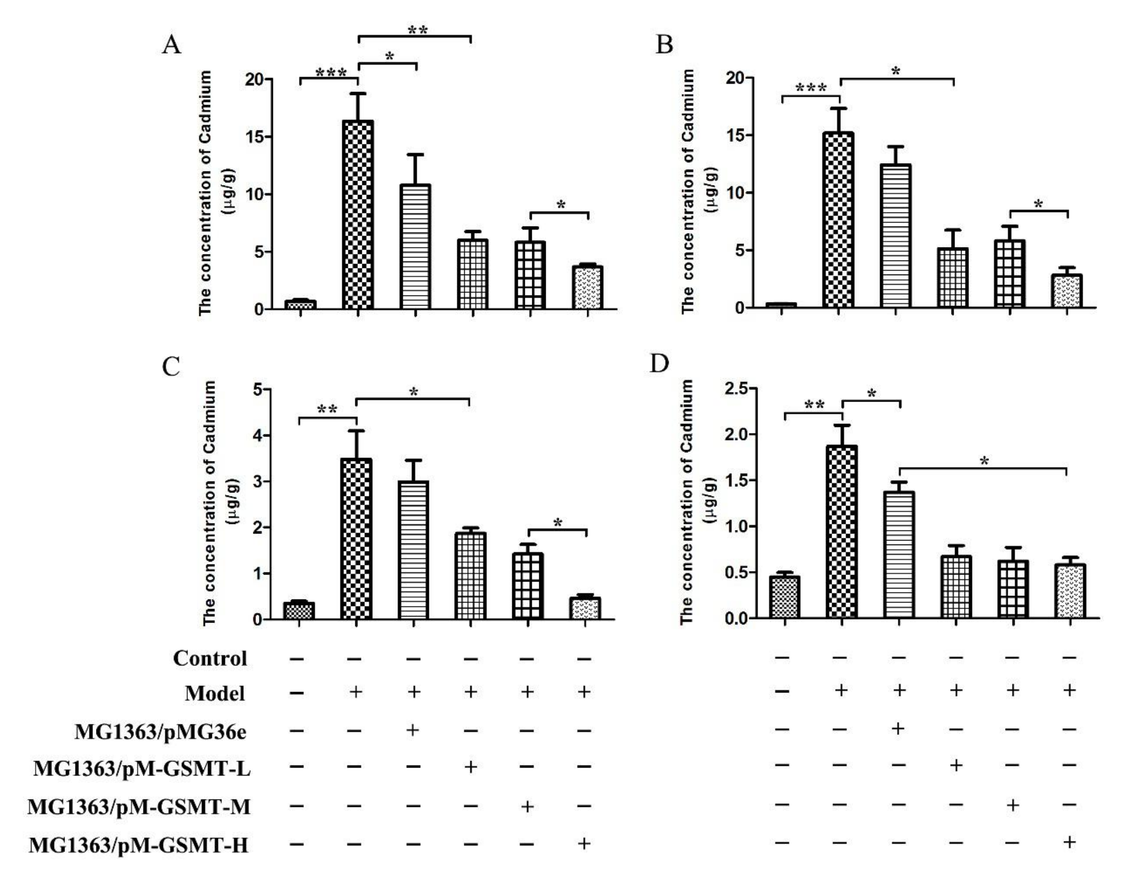


图 10.不同处理组大鼠肾、肝、脑、睾丸组织中 Cd^{2+}的含量

Figure 10. Cadmium concentration of treated rats in kidney, liver, brain and testis.

A：kidney；B：liver；C：brain；D：testis

（MG1363/pM-GSMT-L：treatment of low dose recombinant L. lactis; MG1363/pM-GSMT-M：treatment of middle dose recombinant L. lactis; MG1363/pM-GSMT-H：treatment of high dose recombinant L. lactis; *：p< 0.05;**：p< 0.01；***：p< 0.001）

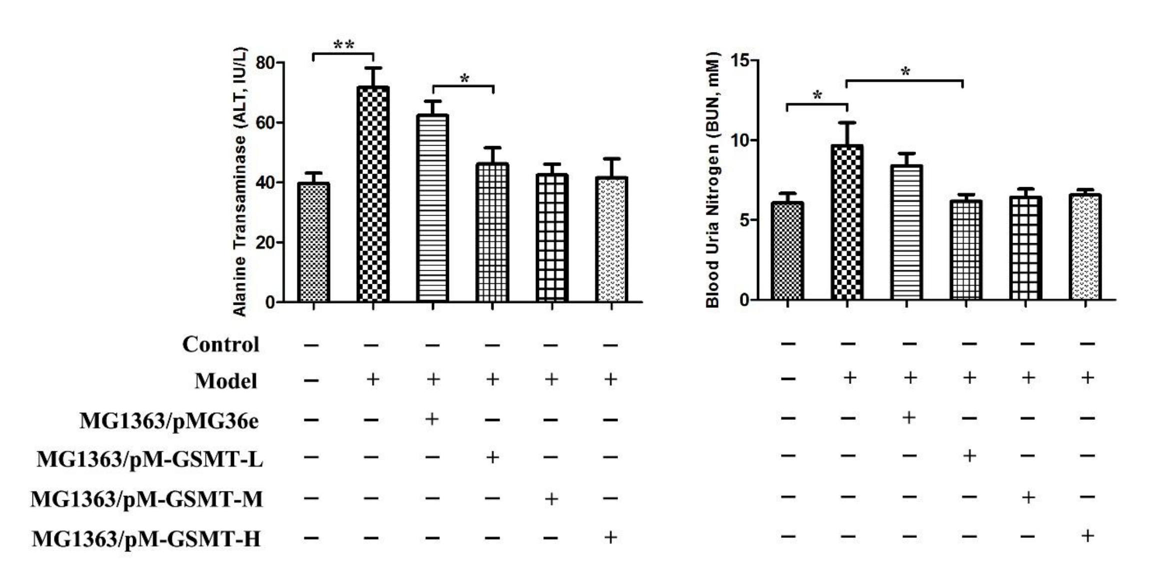


图 11.不同处理组大鼠血清中丙氨酸转移酶及尿素含量分析

Figure 11. Blood ALT and BUN concentration of treated rats

（MG1363/pM-GSMT-L：treatment of low dose recombinant *L. lactis*; MG1363/pM-GSMT-M：treatment of middle dose recombinant *L. lactis*; MG1363/pM-GSMT-H：treatment of high dose recombinant *L. lactis*; *：p< 0.05;**：p< 0.01）

2.6 大鼠肝、肾、睾丸组织形态学分析

实验完成后，收集正常对照组、模型组、对照乳酸菌组及重组乳酸菌高剂量处理组大鼠的肝、肾、睾丸并制成切片染色观察。在肾脏方面，模型组大鼠肾小管明显扩张，肾近曲小管和远曲小管有水样变性，管腔增大，间质水肿，部分细胞坏死脱落。此外，肾小管部分细胞发生凋亡。乳酸菌对照组大鼠部分肾小管萎缩，有死亡细胞；肾近曲小管上皮细胞有部分浑浊，但管腔增大程度低于模型组。而重组乳酸菌高剂量组大鼠的肾组织切片情况与正常组相当，但仍存在少量细胞坏死情况（图 12）。

在肝脏方面，模型组大鼠肝脏外观颜色呈暗黑色。病理结果显示，肝细胞呈现疏松肿胀、肝小梁拥挤、排列不规则、肝窦受压变窄且中央静脉有明显充血现象。对照乳酸菌处理组切片中可见肝细胞的疏松肿胀及中央静脉充血，但与模型组相比，损伤症状有所改善。高剂量乳酸菌处理组中肝损伤不明显（图 13）。

在睾丸方面，模型组大鼠睾丸间质组织中大量充血，间质细胞明显减少；睾丸精曲小管变薄、上皮排列紊乱；曲精细管内各级生精细胞层次紊乱、多呈空泡状变性坏死、精子数量显著减少。对照乳酸菌处理组大鼠睾丸内间质细胞数量比模型组的略多，但曲精小管还存在管壁变薄，管内生精细胞数量较正常组的要少等现象。高剂量乳酸菌处理组中曲细精管形态、间质细胞数量和精子发育等指标均与正常组相当（图 14）。

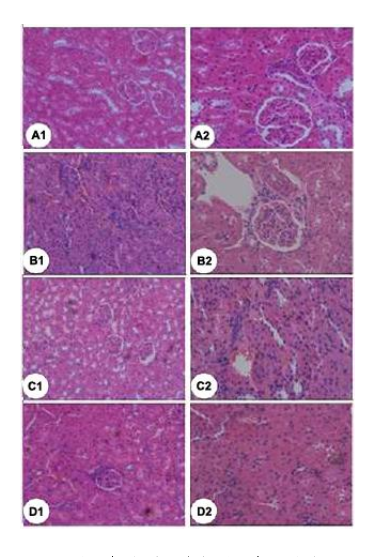


图 12 不同处理组大鼠肾脏组织病理图（HE 染色）

Figure 12. Hematoxylin-eosin staining on kidney of treated rats

A：Control；B：Model；C：MG1363/pMG36e（2×10^{11} CFU/d）；D：MG1363/pM-GSMT-H（2×10^{11} CFU/d）

（A1、B1、C1、D1：200X；A2、B2、C2、D2：400 X）

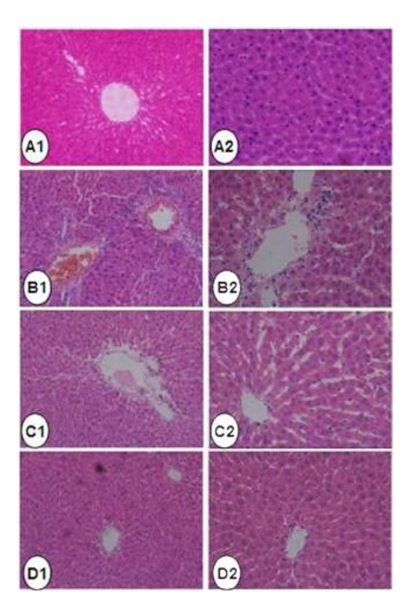


图 13 不同处理组大鼠肝脏组织病理图（HE 染色）

Figure 13. Hematoxylin-eosin staining on liver of treated rats

A：Control；B：Model；C：MG1363/pMG36e（2×10^{11} CFU/d）；D：MG1363/pM-GSMT-H（2×10^{11} CFU/d）

（A1、B1、C1、D1：200X；A2、B2、C2、D2：400 X）

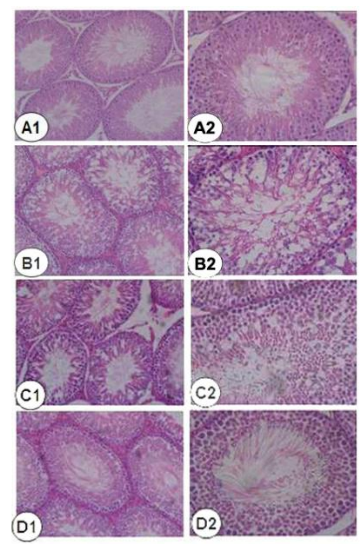


图 14 不同处理组大鼠睾丸组织病理图（HE 染色）

Figure 14. Hematoxylin-eosin staining on testis of treated rats

A：Control；B：Model；C：MG1363/pMG36e（2×10^{11} CFU/d）；D：MG1363/pM-GSMT-H（2×10^{11} CFU/d）

（A1、B1、C1、D1：200X；A2、B2、C2、D2：400 X）

3 讨 论

镉是一种常见的有毒重金属，其可通过皮肤、呼吸道、消化道等途径进入人体并对肝脏肾脏、脑及生殖器官造成不可逆转的损伤。现时，在临床上对急性镉中毒患者可用 DMSA、DMPS 或 DDTC[11-13]等螯合剂来治疗。然而，对于低剂量 Cd^{2+}持续暴露对身体的危害，人们往往感觉不明显而常常忽视。由于 Cd^{2+}的半衰期非常长，且能在生物体内富集，因此，其对人体重要器官造成的损伤都是严重和不可逆的。由此可见，防止和减少有毒 Cd^{2+}经胃肠道摄入是彻底解决其对人体危害的关键策略之一。乳酸菌是公认的安全微生物并可长期口服等优点，在新型疫苗、免疫制剂、代谢疾病药物及重金属中毒防治药物的研发方面都具有巨大的潜力[23]。

在本研究中，制备表达重组融合蛋白 GSMT 的乳酸乳球菌可以有效减少有毒 Cd^{2+}经胃肠道进入大鼠体内，进而降低其对动物主要脏器功能的破坏。首先，食物中的 Cd^{2+}在重组乳酸菌的表面积聚，然后通过受体或者自由扩散的方式进入到胞内。GSMT 迅速结合 Cd^{2+}并形成稳定无毒的金属离子-蛋白复合体。由于乳酸菌并不能在动物肠道内定殖，因此，7-10天后随粪便排出，从而实现预防镉慢性中毒的目的。对照乳酸菌也可以通过表面吸附方式除去部分 Cd^{2+}，然而，过量重金属离子的积聚会导致乳酸菌的死亡并释放表面吸附的 Cd^{2+}，因此，与乳酸工程菌相比，其降低 Cd^{2+}污染的效果不显著。

本论文中的重组乳酸工程菌并不能完全消除食源中镉的污染，其主要原因可能是部分

Cd^{2+}被肠道其它细菌吸附以及重组蛋白 GSMT 表达量太低所致。在本研究对重组蛋白 GSMT 分离纯化过程中，最终的蛋白平均得率仅为 1 mg/L，远低于大肠杆菌中 163 mg/L 的平均表达水平[24]。为此，增加载体的表达异源蛋白能力或者将目的基因插入到乳酸菌基因组中并利用其高表达基因的启动子进行组成型表达是实现利用工程菌完全阻隔有毒重金属离子进入人体内的主要方法[25]。

原子吸收光谱及组织切片结果表明，尽管 Cd^{2+}在睾丸中富集量远低于肝脏和肾脏，然而，其对睾丸曲细精管结构、间质细胞数量以及精子的生成发育均有显著的病理影响。睾丸间质细胞是男性雄激素最主要的来源（95%），其数量的减少直接影响血清雄激素的含量，进而引起雄激素缺乏相关疾病[26]。在本研究中，高剂量的重组乳酸菌能将 Cd^{2+}在睾丸内的含量降低到与正常组相同，然而，睾丸切片中仍能观察到异常的地方，尤其是睾丸间质细胞的数量。这个结果提示极低剂量的镉对男性生殖系统，尤其是间质细胞的发育和功能调控都有严重的危害。

总之，在本研究中构建了一株以α-半乳糖苷酶作为抗性筛选标记、表达 GST-SUMO-MT 融合蛋白的乳酸工程菌。每天口服该重组菌，可以显著防止食物中有毒 Cd^{2+}经胃肠道进入动物体内，从而有效预防食源镉污染对身体脏器功能的损伤。

参考文献

[1] Bertin G, Averbeck D. Cadmium: cellular effects, modifications of biomolecules, modulation of DNA repair and genotoxic consequences (a review). Biochimie, 2006, 88(11): 1549-1559.

[2] Roccheri M C, Agnello M, Bonaventura R, et al. Cadmium induces the expression of specific stress proteins in sea urchin embryos. Biochemical and biophysical research communications, 2004, 321(1): 80-87.

[3] Chen P, Parmalee N, Aschner M. Genetic factors and manganese-induced neurotoxicity. Frontiers in genetics, 2014, 5: 265.

[4] Zhai Q, Narbad A, Chen W. Dietary strategies for the treatment of cadmium and lead toxicity. Nutrients, 2015, 7(1): 552-571.

[5] Kjellström T. Mechanism and epidemiology of bone effects of cadmium. IARC Scientific publications, 1991 (118): 301-310.

[6] Horiguchi H, Oguma E, Kayama F. Cadmium induces anemia through interdependent progress of hemolysis, body iron accumulation, and insufficient erythropoietin production in rats. Toxicological Sciences, 2011, 122(1): 198-210.

[7] Yang J M, Arnush M, Chen Q Y, et al. Cadmium-induced damage to primary cultures of rat Leydig cells. Reproductive toxicology, 2003, 17(5): 553-560.

[8] Compounds C. Technology Transfer Network Air Toxics Web Site . Environmental Protection Agency, Washington, DC, USA, 2007.

[9] 张建辉,王芳斌,汪霞丽,等. 湖南稻米镉和土壤镉锌的关系分析. 食品科学，2015，36(22): 156-160. ZHANG J, WANG F, WANG X, et al. Relationship between Cd and Zn in soil and in rice grain. Food Science, 2015, 36 (22): 156–160.

[10] 苗亚琼, 林清. 广西土壤重金属镉污染及对人体健康的危害.环境与可持续发展, 2016(5): p. 171-173. MIAO Y, LIN Q. Cadmium pollution on soils of Guangxi Province and hazard to human health. Environment and sustainable development, 2016(5): 171-173.

[11] Lemos V A, dos Santos Vieira E V. Method for the determination of cadmium, lead, nickel, cobalt and copper in seafood after dispersive liquid–liquid micro-extraction. Food Additives & Contaminants: Part A, 2014, 31(11): 1872-1878.

[12] Aposhian HV, Maiorino RM, Gonzales-Ramirez D, et al. Mobilization of heavy metals by newer, therapeutically useful chelating agents. Toxicology, 1995, 97: 23–38.

[13] Bernhoft R A. Cadmium toxicity and treatment. The Scientific World Journal, 2013, 394652.

[14] Vašák M. Advances in metallothionein structure and functions. Journal of Trace Elements in Medicine and Biology, 2005, 19(1): 13-17.

[15] Qu W, Diwan B A, Liu J, et al. The metallothionein-null phenotype is associated with heightened sensitivity to lead toxicity and an inability to form inclusion bodies. The American journal of pathology, 2002, 160(3): 1047-1056.

[16] Liu J, Kershaw W C, Klaassen C D. The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture. Toxicology and applied pharmacology, 1991, 107(1): 27-34.

[17] Waalkes M P, Liu J, Goyer R A, et al. Metallothionein-I/II double knockout mice are hypersensitive to lead-induced kidney carcinogenesis. Cancer Research, 2004, 64(21): 7766-7772.

[18] Steidler L, Rottiers P. Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006, 1072(1): 176-186.

[19] Song AA, In LLA, Lim SHE, et al. A review on *Lactococcus lactis*: from food to factory. Microbial cell factories, 2017, 16(1): 139.

[20] Xiao X, Zhang C, Liu D, et al. Prevention of gastrointestinal lead poisoning using recombinant *Lactococcus lactis* expressing human metallothionein-I fusion protein. Scientific reports, 2016, 6: 23716.

[21] Steidler L, Rottiers P. Therapeutic drug delivery by genetically modified *Lactococcus lactis*. Annals of the New York Academy of Sciences, 2006, 1072(1): 176-186.

[22] Medina M, Villena J, Salva S, et al. Nasal administration of *Lactococcus lactis* improves local and systemic immune responses against Streptococcus pneumoniae. Microbiology and immunology, 2008, 52(8): 399-409.

[23] Ohkouchi K, Kawamoto S, Tataugawa K, et al. Prophylactic effects of Lactobacillus oral vaccine expressing a Japanese cedarpollen allergen. Journal of Bioscience bioengineering, 2012, 113(4): 536–541.

[24] Huang Y, Su Z, Li Y, et al. Expression and Purification of glutathione transferase-small ubiquitin-related modifier-metallothionein fusion protein and its neuronal and hepatic protection against D-galactose-induced oxidative damage in mouse model. Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics, 2009, 329(2): 469-478.

[25] Steidler L, Neirynck S, Huyghebaert N, et al. Biological containment of genetically modified *Lactococcus lactis* for intestinal delivery of human interleukin 10. Nature biotechnology, 2003, 21(7): 785-789

[26] Liu H, Yang Y, Zhang L, et al. Basic fibroblast growth factor promotes stem Leydig cell development and inhibits LH-stimulated androgen production by regulating microRNA expression. The Journal of steroid biochemistry and molecular biology, 2014, 144: 483- 491.

Prevention of gastrointestinal cadmium poisoning with food-grade *Lactococcus lactis* strain expressing metallothionein fusion protein

PENG De-lian[1] LIU Xia [1] HUANG Ya-dong[1,2] XIAO Xue**[1] SU Zhi-jian[1]

（1 Department of Cell Biology, College of Life Science and Technology, Jinan University, Guangzhou 510632）

（2 Guangdong Provincial Key Laboratory of Bioengineering Medicine, Institute of Biomedicine, Jinan University, Guangzhou 510632）

Abstract Objective: Cadmium is an extremely toxic pullutant. The characterists of having long half-life and resistance to environmental degradation make it easy to accumulate in human organs and then cause irreversible damage. Blocking cadmium uptake via the gastrointestinal tract is an important prevention strategy. Methods: the recombinant *Lactococcus lactis* strainMG1363/pM-GSMT were constructed, which expressed fusion protein glutathione S-transferase(GST)-small molecule ubiquitin-like modifier protein (SUMO)-metallothionein-I (GST-SUMO-MT) and using α- galactosidase as marker. The ability of binding cadmium or zinc ions was detected by the Inductively Coupled Plasma-Optical Emission Spectrometry (ICP-OES). For the animal experiments, the male Sprague-Dawley rats were given a daily oral administration of cadmium chloride solution (5mg/kg/d) and MG1363/pM-GSMT with different dosages respectively. This experiment was performed for 8 weeks and the tissues (liver, kidney, brain and testis) were collected. The accumulation of cadmium in tissues was determined by atomic absorption spectrometric analysis. The concentrations of alanine aminotransferase (ALT) and blood uria nitrogen (BUN) were analyzed by a full automated hematology analyzer. The pathological changes of each tissue treated by cadmium with/without MG1363/pM-GSMT were compared and analyzed using hematoxylin - eosin staining. Results: The recombinant strain MG1363/pM-GSMT with α-galactosidase resistant marker was constructed, which binding capacity of cadmium and zinc ions were 3.52 and 1.60 fold higher than that of control strain MG1363/pMG36e. After daily $CdCl_2$ treatment for 8 weeks, the results showed that the cadmium concentration increased significantly in the kidney, liver, brain and testis of experimental group compared with the normal group. The accumulated cadmium impaired the functions of liver and kidney. Oral administration of MG1363/pM-GSMT to SD rats that were also treated with cadmium chloride daily significantly blocked the cadmium uptake via gastrointestinal tract and further decreased the impairments of main tissues in morphology and functions. Conclusion: This study provides a potential biomaterial and application for preventing cadmium poisoning via the digestive tract.

Key words *Lactococcus lactis* metallothionein cadmium poisoning prevention